



FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**EPOTILONAS, UNA ALTERNATIVA EN EL
CAMPO DE LOS ANTITUMORALES**

Autores: María Molinero Muñoz y Nerea Fernández Arberas

D.N.I.: 53458248S y 47283775F

Tutor: Mercedes T. Grande González

Convocatoria: Junio 2016

1.- RESUMEN

Actualmente el cáncer de mama es el tumor más frecuente entre la población femenina tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo y su incidencia aumenta cada año de forma constante. Esta situación está incitando a la investigación de nuevos tratamientos eficaces no solo en etapas tempranas de la enfermedad sino también en estadíos avanzados y casos resistentes. Las epotilonas son metabolitos secundarios de la bacteria *Sorangium cellulosum* con la propiedad de estabilizar los microtúbulos de las células tumorales, bloqueando así el ciclo celular a nivel de la mitosis. Las primeras síntesis totales se describieron en 1997 por los grupos de Danishefsky¹, Nicolaou² y Schinzer³ pero debido a su bajo rendimiento se procedió a su obtención por fermentación. Desde el descubrimiento de su actividad antitumoral hasta la actualidad, se han estudiado las ventajas que ofrecen estos compuestos frente al paclitaxel, fármaco con el mismo mecanismo de acción. Además de tener mayor potencia antiproliferativa de células tumorales, son eficaces en casos de tumores resistentes a los fármacos estabilizadores de microtúbulos. Para aumentar la actividad de estas moléculas se han propuesto ciertas modificaciones que han llevado al desarrollo de nuevas epotilonas más activas. Hasta el día de hoy, se han realizado ensayos clínicos sobre 5 epotilonas. Una de ellas, la ixabepilona, se encuentra aprobada con el nombre de Ixempra[®] por la FDA desde 2007 para el tratamiento del cáncer de mama avanzado o metastásico. La epotilona D por otro lado, está siendo estudiada como posible fármaco para el tratamiento del Alzheimer.

2.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las epotilonas A (Epo A) y B (Epo B) son compuestos naturales aislados por primera vez a partir de la bacteria *Sorangium cellulosum* So ce90 en las orillas del río Zambesi en Suráfrica. Fueron descubiertos en 1987 por los investigadores Höfle, Reichenbach y col. en Alemania, evaluándose en un primer momento como fungicidas frente a *Mucor hiemalis*.⁴ Posteriormente en 1995 investigadores de los laboratorios Merck (EEUU) observaron que poseían una potente actividad antitumoral, ya que interaccionaban con la tubulina logrando la estabilización de los microtúbulos. Es decir, era un mecanismo de acción análogo al del paclitaxel (Taxol[®]).⁵

A pesar de la lucha por la patente de las epotilonas entre los laboratorios al inicio de su descubrimiento, no fue hasta julio de 1996 cuando se reveló la estereoquímica completa de las

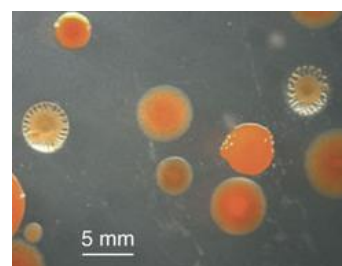


Fig.1: Colonias de *Sorangium celullosum*

Epo A y B.⁶ A partir de ese momento, algunos laboratorios comenzaron a desarrollar distintas estrategias de síntesis. Las primeras síntesis totales fueron publicadas a principios de 1997 por los grupos de Danishefsky¹, Nicolaou² y Schinzer³. Más tarde, se observó que las epotilonas C y D poseían una actividad antiproliferativa de células tumorales similar a las Epo A y B.⁷

Dado que las síntesis totales poseían un rendimiento cercano al 1%, se clonó el cluster de genes responsable de la biosíntesis de las Epo A y B y se coexpresó junto con los genes de *Streptomyces coelicolor*, actinomiceto que crece diez veces más rápido que el productor natural *Sorangium cellulosum*.⁸ De esta manera, a través de la fermentación bacteriana se lograron producir grandes cantidades de estos compuestos para llevar a cabo estudios clínicos.

Las epotilonas mostraron ser capaces de inhibir la glicoproteína P, proteína responsable de la resistencia a los fármacos de los tumores, y ser eficaces en los casos en los que se producen mutaciones en la tubulina. Por todo esto, las epotilonas muestran una actividad antitumoral elevada en células resistentes a fármacos (MDR). Esto supuso un importante avance en el campo de los antitumorales que se conocían hasta el momento. A día de hoy la ixabepilona está aprobada por la FDA con el nombre de Ixempra®, y otras se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos.

3.- OBJETIVOS

Para la realización de este trabajo se plantearon una serie de objetivos:

1. Describir la estructura química de las epotilonas detallando los fragmentos estructurales que las componen.
2. Analizar el mecanismo de acción de las epotilonas estableciendo relaciones con el del paclitaxel (PTX).
3. Describir las primeras estrategias de síntesis química total de las epotilonas.
4. Estudiar las modificaciones estructurales que suponen una variación de la actividad antitumoral
5. Examinar la situación actual de los ensayos clínicos de las epotilonas y conocer las indicaciones terapéuticas.

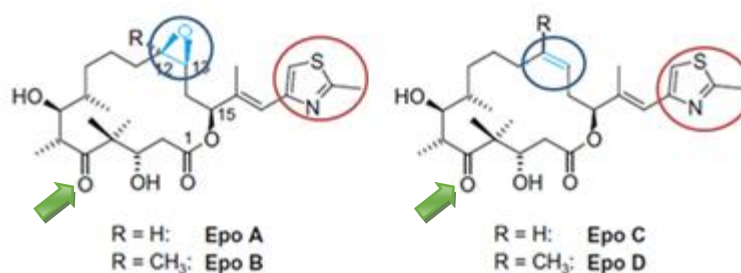
4.- METODOLOGÍA

Se han realizado búsquedas bibliográficas en bases de datos como PubMed combinando las palabras clave “epothilone”, “clinical trial”, “paclitaxel”, “Alzheimer”, “glicoproteína P”, “metathesis”, “antitumoral” entre otras.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- Estructura química

Las epotilonas son macrolactonas de 16 átomos que deben su nombre a las subunidades estructurales que las componen: epóxido, tiazol y cetona. Las deoxiepotilonas C y D son análogos de las epotilonas naturales que incorporan un doble enlace en Z entre C12 y C13 en lugar del epóxido en cis.



(Pfeiffer y col. 2009)

5.2. Mecanismo de acción

La actividad citotóxica de las epotilonas se debe al bloqueo que ejercen sobre el ciclo celular a nivel de la mitosis por alteración del equilibrio de polimerización/despolimerización de la tubulina. La tubulina es una proteína heterodimérica formada por monómeros α y β que se unen formando dímeros (A), cuyo ensamblaje da lugar a protofilamentos (B) y finalmente a los microtúbulos (C) (polimerización).

Para que se produzca la polimerización de la tubulina es necesaria la hidrólisis del cofactor trifosfato de guanosina (GTP) que se encuentra unido a la β -tubulina, mientras que la tubulina unida a GDP es propensa a la despolimerización (D). Es decir, se trata de un proceso dinámico entre los microtúbulos y los dímeros de tubulina esencial para la célula.⁹

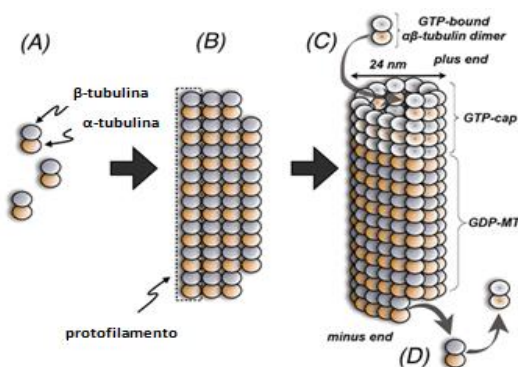


Fig. 2: Polimerización de tubulina ⁹

Los microtúbulos resultantes de la polimerización de la tubulina son los componentes principales del huso mitótico por lo que resultan imprescindibles en el proceso de mitosis así como en la citocinesis, la angiogénesis y el transporte vesicular. Por ello, se han convertido en una importante diana de fármacos antitumorales, siendo los agentes moduladores de tubulina compuestos capaces de inhibir o promover el ensamblaje de esta proteína impidiendo así, la

división celular. Entre los compuestos activadores de la polimerización de tubulina, cabe destacar el PTX y las epotilonas.

El mecanismo de acción de las epotilonas se basa en la estabilización de microtúbulos, la inducción de la polimerización de la tubulina por unión específica a la subunidad β del dímero $\alpha\beta$ de dicha proteína y la inhibición de la despolimerización inducida por calcio. Todo ello conduce a la parada del ciclo celular en la fase G₂/M y posterior apoptosis de la célula.¹⁰

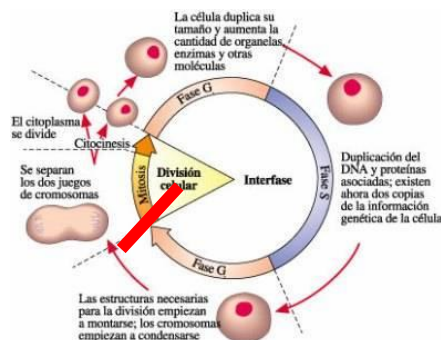


Fig. 3: Fases del ciclo celular

5.3.- Analogías y diferencias con el Paclitaxel (PTX)

Las epotilonas comparten el mismo mecanismo de acción que PTX, aislado originariamente de la corteza del tejo *Taxus brevifolia*. Dado que el contenido de PTX en la corteza es muy bajo, actualmente se utilizan los brotes de *Taxus baccata* para obtener un intermedio que por semisíntesis se transforma en paclitaxel (Taxol®) o docetaxel (Taxotere®).¹¹ El PTX es capaz de unirse a sitios específicos de la β -tubulina con alta afinidad para aumentar la polimerización de la tubulina a microtúbulos en ausencia de GTP.¹²

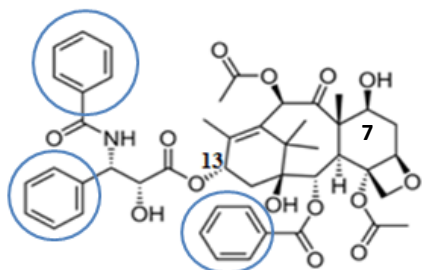
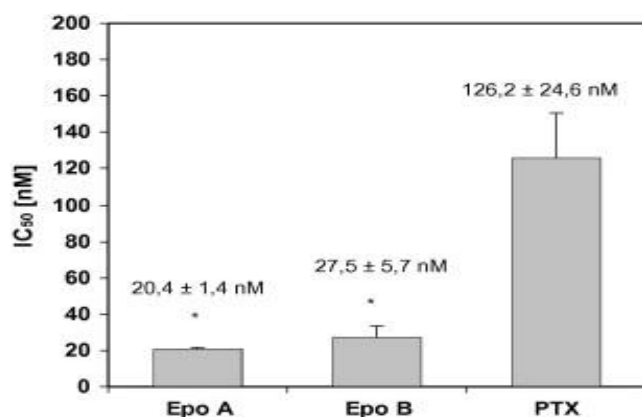


Fig. 4: Paclitaxel

Su estructura química es un diterpeno complejo que contiene fundamentalmente un anillo de taxano con un anillo de oxetano y una cadena lateral de éster en la posición C13.¹²

El PTX está indicado en carcinoma de ovario, de mama, de pulmón no microcítico avanzado y sarcoma de Kaposi, entre otros, pudiendo ser tratamiento de primera o segunda línea, o como tratamiento adyuvante, dependiendo del tipo de carcinoma.¹³

Las epotilonas ofrecen algunas ventajas destacables frente al PTX. En primer lugar, son solubles en agua, lo que facilita su formulación. Por otro lado, se ha comprobado que la potencia antiproliferativa de las células tumorales de las epotilonas A y B en la línea celular de cáncer de ovario SKOV-3 es mayor que la del PTX. Tras 72 h de incubación con Epo A, Epo B y PTX se midió la IC₅₀ y se comprobó que la actividad de las epotilonas era de seis y cinco veces mayor, respectivamente, que la del PTX.¹⁴



Los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar de cinco experimentos independientes.

(*) estadísticamente significativo, en comparación con las muestras incubadas con PTX.

Los resultados obtenidos por simulaciones de dinámica molecular predicen que las epotilonas pueden atravesar los poros de las paredes de los microtúbulos más fácilmente que el PTX. Esto se debe a la mayor flexibilidad de la macrolactona de la epotilona comparado con el núcleo rígido del PTX.

En general, la resistencia a los fármacos estabilizadores de microtúbulos se debe a dos factores: la sobreexpresión de la glicoproteína P y la sobreexpresión de determinadas isoformas de la tubulina. La glicoproteína P es un transportador celular activo de la membrana plasmática con un papel detoxificante y de protección celular, ya que facilita la eliminación de metabolitos y de diferentes sustancias a la bilis, orina o luz intestinal. Muchas líneas celulares cancerígenas sobreexpresan esta proteína bombeando el fármaco al medio extracelular, reduciendo así su absorción y concentración intracelular. Sin embargo, las epotilonas son pobres sustratos de esta proteína, lo que les hace menos sensibles a este tipo de resistencia, resultando de una mayor efectividad que el PTX.

Así por ejemplo, en un ensayo con células de riñón caninas transfectadas con MDR humana (glicoproteína P), se observó que la epotilona D tiene una relación de eflujo cercano a la unidad, lo que indica que no es transportada por la glicoproteína P, siendo P_{app} el coeficiente de permeabilidad aparente desde A (membrana apical) a B (membrana basolateral) y viceversa, de la célula.¹⁵

$$\text{Relación de eflujo} = \frac{P_{app\text{B-A}}}{P_{app\text{A-B}}}$$

Compuesto	P_{app} (A-B) (10^{-6} cm/s)	P_{app} (B-A) (10^{-6} cm/s)	Relación de eflujo (B-A)/(A-B)
CNDR-66 (epo D)	30	46,8	1,6

Estos resultados se confirmaron con otro ensayo, en el que se analizó la concentración en cerebro y plasma en ratones tras la administración intraperitoneal de distintas epotilonas (CNDR-66, CNDR-85, CNDR-86, CNDR-87, CNDR-88, CNDR-89, CNDR-90), PTX y

análogos de éste (CNDR-3 y CNDR-29). A las 2 horas, todas las epotilonas ensayadas, a excepción de la CNDR-90 (ixabepilona o aza-Epo B) presentaron una relación C/P (cerebro/plasma) superior a la unidad, a diferencia del PTX y sus análogos. A las 24 h, la concentración de epotilonas en plasma fue prácticamente indetectable, excepto para la ixabepilona. Pero la relación C/P a las 24 h para todas las epotilonas fue mucho mayor que a las 2 h, lo que indica que existe una retención de estos compuestos en el cerebro.¹⁵

Compuesto	2 horas (5 mg/kg)			24 horas (10 mg/kg)		
	Plasma	Cerebro	C/P ⁽¹⁾	Plasma	Cerebro	C/P
	ng/ml	ng/g		ng/ml	ng/g	
Paclitaxel	1286	85	0,07			
CNDR-3	15	ILD ⁽²⁾	NC ⁽³⁾			
CNDR-29	389	ILD	NC			
CNDR-66	14	109	7,6	ILD	64	NC
CNDR-85	5	236	52,9	1,7	259	157
CNDR-86	20	86	4,3	0,5	88	118
CNDR-87	1,4	71	52	ILD	28	NC
CNDR-88	12	30	2,6	6,1	45	7,3
CNDR-89	6,8	24	3,5	ILD	13	NC
CNDR-90	319	142	0,4	41	107	2,6

(1): Relación [cerebro]/[plasma]
(2): Inferior al límite de detección
(3): No calculado

Por tanto, dado que para todas las epotilonas estudiadas la concentración en cerebro es mayor que en plasma a las 24 horas de su administración, se puede afirmar que éstas no son sustrato de la glicoproteína P y por ello no son expulsadas al medio extracelular. Sin embargo, para el PTX y sus análogos, a las 2 horas de su administración su concentración en plasma es superior que en cerebro, o incluso indetectable en éste, lo que indica que éstos sí son expulsados a plasma por dicha proteína.

Respecto a la tubulina y su papel en la resistencia a fármacos antitumorales es importante saber que al menos siete isoformas de la β -tubulina se expresan de manera diferente en distintos tipos de células. La expresión de la isoforma β I es más abundante en general, mientras que la isoforma β III se localiza prevalentemente en tejido neuronal y testículos y su expresión se asocia con cánceres resistentes. El PTX muestra una mayor afinidad por la isoforma β I que por la β III por lo que las células cancerígenas pueden desarrollar resistencia a este fármaco por sobreexpresión de la isoforma β III. Sin embargo, las epotilonas se unen de la misma manera a ambas isoformas, siendo efectivas a las líneas celulares cancerígenas resistentes a PTX.⁷ Además, se ha demostrado que tanto in vitro como en células MCF7, el efecto estabilizante de la ixabepilona sobre los microtúbulos es mayor cuando el contenido en la isoforma β III está disminuido.

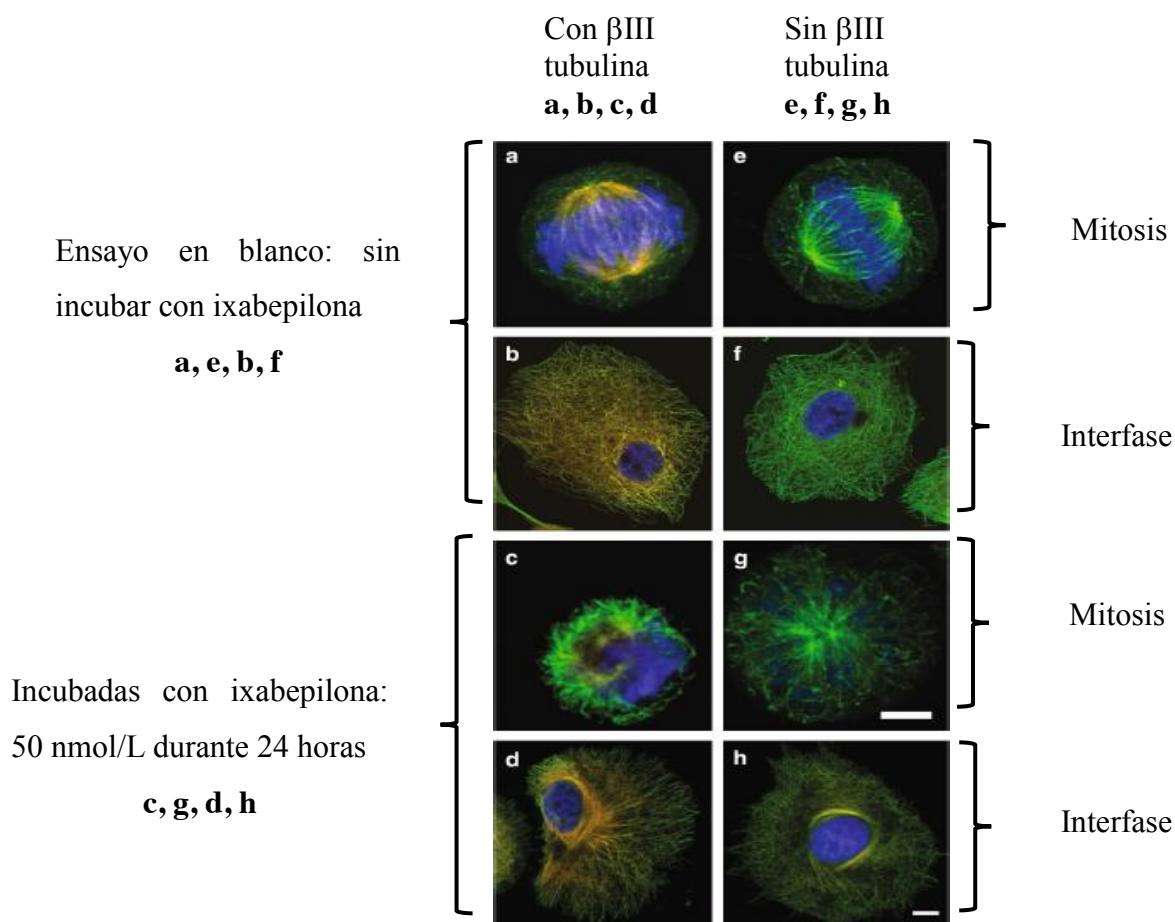
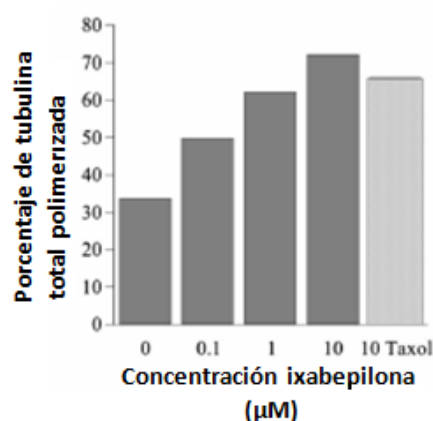


Fig. 5: Mitosis e interfase en inmunofluorescencia ¹⁶

Podemos observar que la eliminación de la isoforma β III de la tubulina no tiene efecto en la morfología celular, pero se observa que la ixabepilona induce en la mitosis la formación de un huso acromático aberrante y microtúbulos engrosados en la interfase. ¹⁶

Respecto a la capacidad de polimerización de microtúbulos se ha realizado un ensayo in vitro en el cual durante 90 minutos se expone tubulina cerebral bovina purificada, en presencia de ixabepilona a diferentes concentraciones y a 30 °C y posteriormente se analiza el sedimento.

En los resultados obtenidos se observa que a medida que se incrementa la concentración de ixabepilona, aumenta progresivamente el porcentaje de tubulina polimerizada. Además, frente a una misma concentración de ixabepilona y Taxol[®] (10 μ M) el porcentaje de polimerización es mayor en el caso de la ixabepilona.



Y por último se observa que para una concentración 10 veces menor de ixabepilona frente a Taxol® el porcentaje de polimerización de microtúbulos es prácticamente el mismo.¹⁶

Por otro lado, por sus propiedades similares a endotoxinas el PTX activa a los macrófagos estimulando la síntesis de citocinas proinflamatorias y la producción de óxido nítrico, mientras que la Epo B se ha comprobado que no actúa sobre las rutas de señalización de endotoxinas, lo que se traduce en una disminución de los efectos adversos relacionados.⁶

5.4.- Sitio de unión común en la tubulina para el PTX y las Epo A y B

Desde el descubrimiento de su actividad estabilizadora de microtúbulos en 1995, se ha estudiado el modo de unión de estos compuestos a la tubulina con el fin de facilitar el diseño de análogos simplificados. Las Epo A y B ocupan el mismo sitio en la subunidad β de la tubulina que los taxanos, aunque dicha unión está mediada por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas diferentes en ambos compuestos.¹⁷

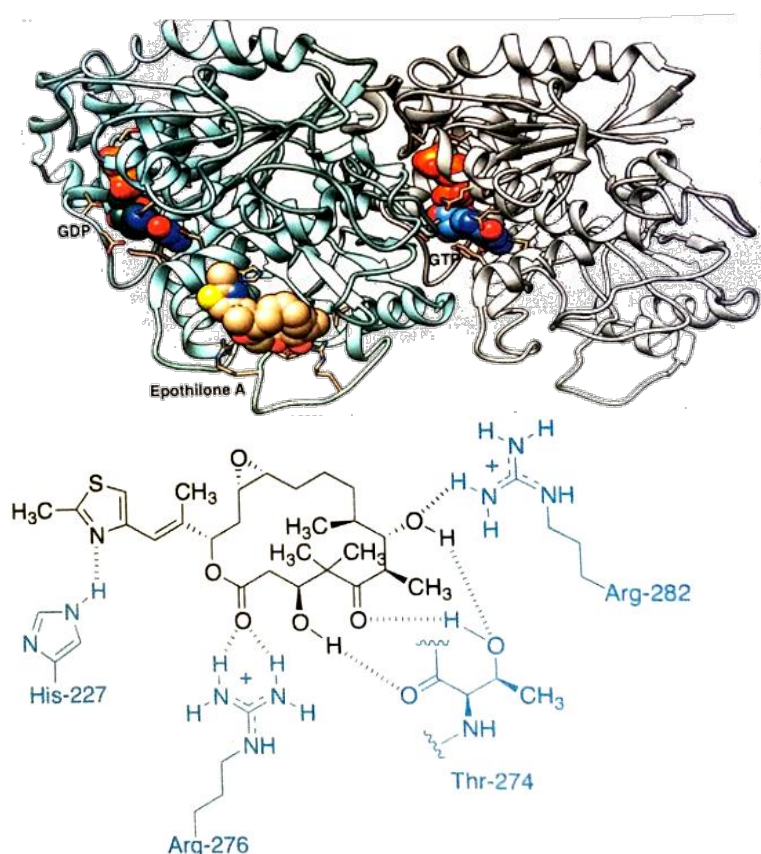


Fig. 6: Interacciones de la Epo A con la β -tubulina¹¹

Se pueden observar las distintas interacciones por enlaces de hidrógeno de la Epo A con la β -tubulina. El nitrógeno del anillo de tiazol de la cadena lateral de C15 interacciona con el resto de His 227. El oxígeno del grupo carbonilo del éster interacciona con el resto de

Arg-276. Los hidrógenos de los grupos hidroxilo en C3 y C7 así como el oxígeno de la cetona en C5 interaccionan con el resto de Thr-274 y el oxígeno del grupo hidroxilo en C7 interacciona a su vez con el resto de Arg-282.

A pesar de que las interacciones de unión a la β -tubulina no son las mismas para la Epo A y el PTX un experimento llevado a cabo por Andreu y Barasoain en 2001, a través de un análogo fluorescente del PTX, el flutax-2, puso de manifiesto que las Epo A y B desplazaban a este. Por ello se puede concluir que ocupan el mismo sitio que el PTX en la β -tubulina aunque no compartan las mismas interacciones.¹⁸

5.5.- Síntesis

La primera síntesis total publicada de las Epo A y B fue en 1997 por el grupo de Danishefsky¹. La ruta sintética incluía una reacción de adición aldólica estereoselectiva, seguida de una macrolactonización y por último una reacción de metátesis olefinica. Posteriormente, Nicolaou² y Schinzer³ publicaron otras rutas sintéticas basadas en estas mismas estrategias.¹⁹

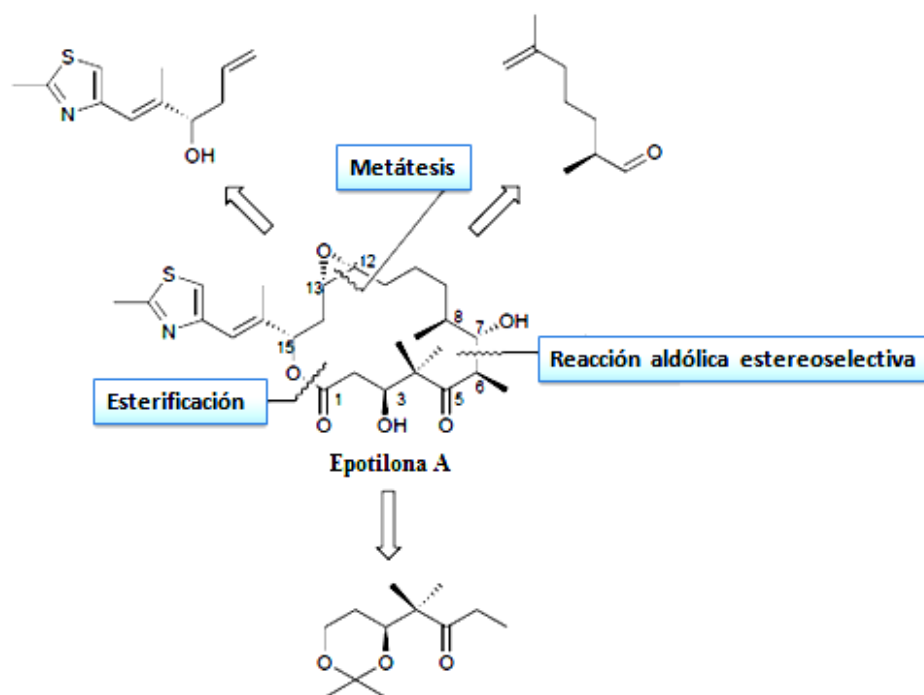


Fig. 7: Análisis retrosintético de la Epo A.³

El desarrollo de la reacción de metátesis supuso un importante avance en el ámbito de la síntesis orgánica y fue motivo del premio Nobel de química concedido a los científicos Chauvin Y., Schrock R. y Grubbs R. en 2005.²⁰

Se trata de un proceso reversible de intercambio de grupos entre dos olefinas (alquenos) en presencia de catalizadores en los cuales participan ciertos metales de transición (fundamentalmente titanio, wolframio, molibdeno o rutenio).²¹

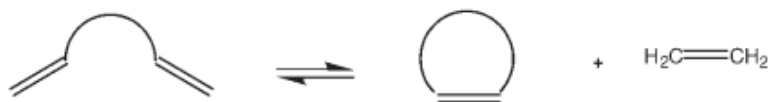


Fig.8: Detalle de metátesis con cierre de anillo (“Ring-closing metathesis”, RCM)²¹

5.6.- Modificaciones estructurales y estereoquímicas

5.6.1. Modificaciones en el grupo éster

A pesar de que se consiguió desarrollar la síntesis total de las Epo A y B, se observó que la estabilidad de éstas era baja debido a las esterasas presentes en el plasma que hidrolizan la lactona. Tratando de evitar este problema de labilidad, se sustituyó el grupo éster por amida, obteniendo así una lactama, la cual es metabólicamente más resistente.

Así, Danishefsky y col. desarrollaron una estrategia de semisíntesis del aza análogo de la Epo B. Se trató Epo B con Pd (PPh₃)₄ en presencia de NaN₃ dando lugar al ácido **95**, con retención de la configuración del C15. La reducción del grupo azida con trimetilfosfina condujo a **96**, y finalmente se cierra el anillo con DPPA, NaHCO₃, DMF (43%) o con EDCI, HOBT, MeCN/DMF (65%) para dar **26** (ixabepilona, aza análogo de la Epo B).¹⁹

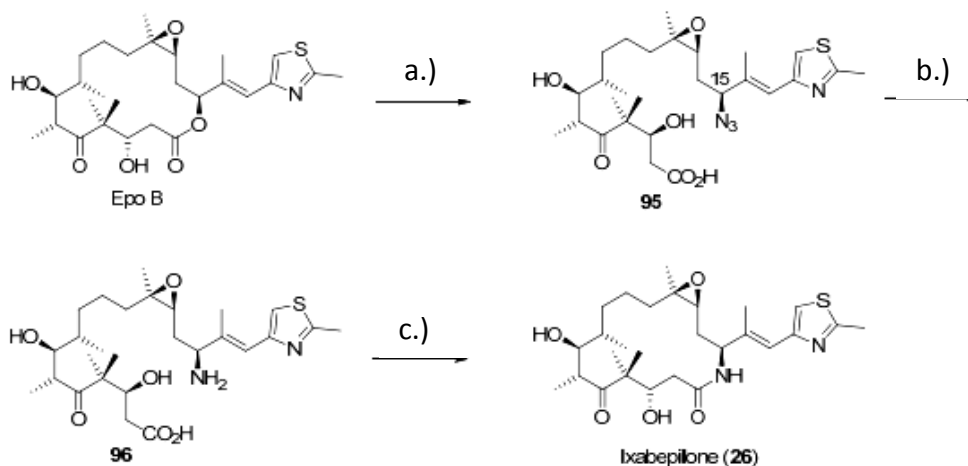
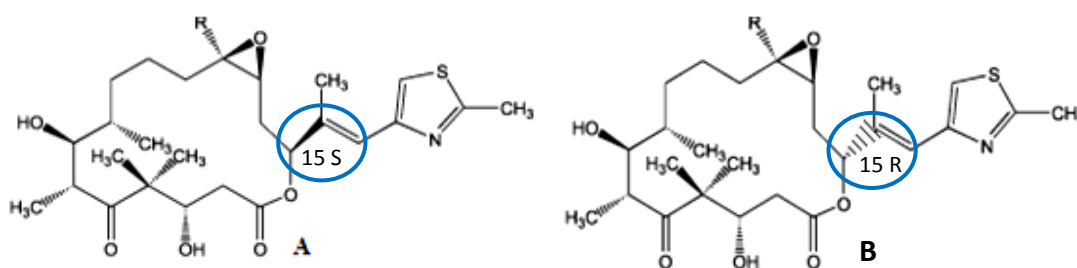


Fig. 9 a) Pd(PPh₃)₄ (10 mol%), NaN₃, THF/H₂O, 45 °C, 70%; b) PMe₃, THF/H₂O, 71%; c) DPPA, NaHCO₃, DMF, 4 °C, 43% or EDCI, HOBT, MeCN/DMF, rt, 65%.

Para las siguientes modificaciones descritas, se parte de la Epo A y se realizan distintas modificaciones para evaluar como influyen en la actividad de la molécula y poder determinar así la configuración más activa.

5.6.2.- Modificaciones en C15 ²²

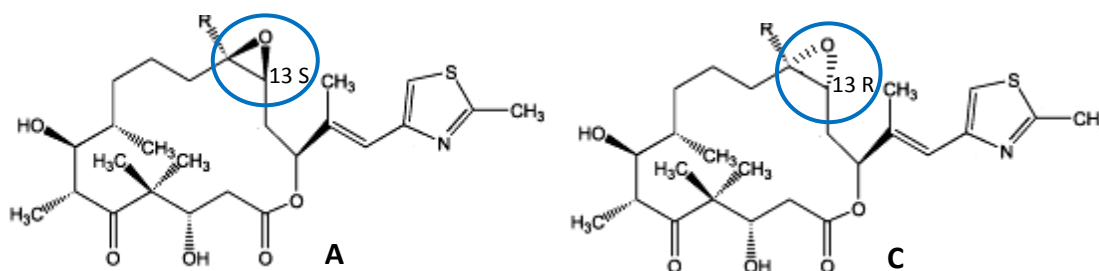
En caso de que C15 tenga configuración S (molécula A), la cadena lateral de este carbono es más o menos plana respecto al anillo de la epotilona. Si por el contrario tiene configuración R (molécula B), la cadena lateral se halla perpendicular a este plano y no es capaz de unirse al bolsillo hidrofóbico con la consiguiente pérdida de afinidad. Por tanto, la configuración S de C15 es esencial para que el nitrógeno de la cadena lateral interaccione con la His 227 de la β -tubulina.



5.6.3.- Modificaciones en C13 ²²

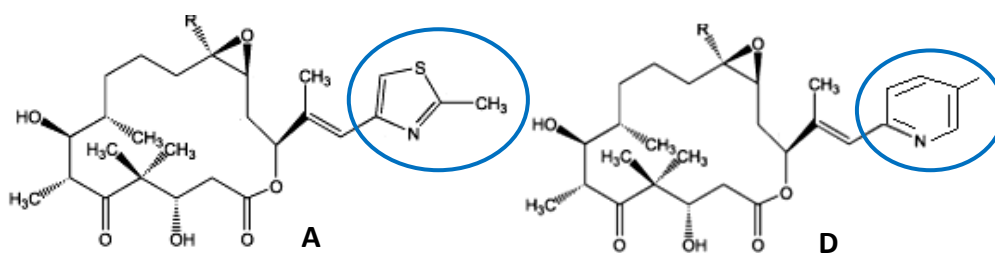
Si cambiamos la estereoquímica del carbono 13 de S (molécula A) a R (molécula C), el compuesto se vuelve inactivo. Esta modificación colocaría a la cadena lateral del C15 en una posición similar al ocupado por esta cuando el C15 tiene estereoquímica R (perpendicular al plano del anillo).

Por lo tanto, la configuración del carbono 13 debe ser S.



5.6.4.- Modificación del anillo de la cadena lateral de C15 ²²

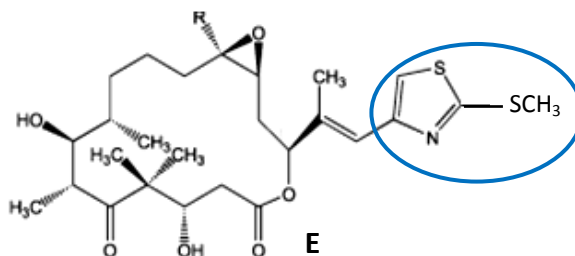
Se realiza un cambio del anillo de tiazol (molécula A) por un anillo de piridina (molécula D) en la cadena lateral de C15. La modificación de tiazol por piridina, no supone ninguna ventaja añadida, en ambos anillos el nitrógeno interacciona con la His 227 de la β -tubulina, siempre y cuando C15 tenga configuración S.



5.6.5. Modificación del sustituyente del anillo de la cadena lateral en C15 ²²

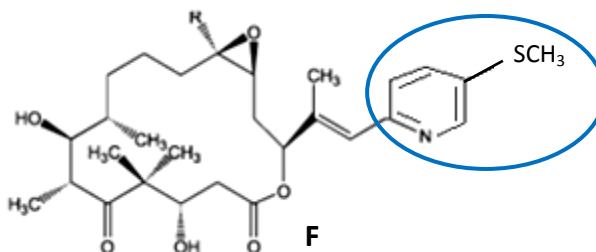
Se evalúan tres sustituyentes: un metilo (sustituyente presente en la Epo A), un hidroximetilo y un metiltio. El aumento o disminución de la afinidad de unión a la β -tubulina por el compuesto, depende del anillo de la cadena lateral a los que están unidos, en el que el nitrógeno del tiazol o piridina debe interaccionar por puente de hidrógeno con la His 227.

- Con un anillo de tiazol (molécula E)



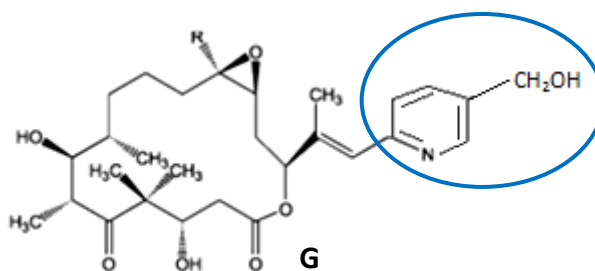
Si se sustituye en el anillo de tiazol el grupo metilo por un metiltio se produce un cambio favorable respecto a la afinidad de unión.

- Con un anillo de piridina (molécula F)

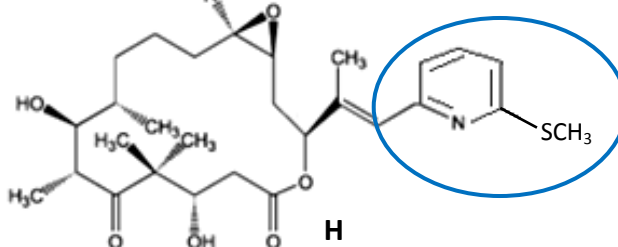


Cuando se realiza en la piridina el cambio de metilo por metiltio, se produce una pérdida de afinidad. Una posible explicación es que el cambio de tiazol a piridina puede haber desplazado el grupo metilo del metiltio y debido al mayor volumen de la cadena lateral, el nitrógeno de la piridina adoptaría una situación menos favorable para interaccionar con His 227.

Si se produce el cambio de metilo a hidroximetilo (molécula G) se produce un cambio ligeramente desfavorable.



Finalmente, se estudia el cambio del grupo metiltio de la posición C5 a C6 del anillo de piridina (molécula H), se aprecia una disminución en la afinidad de unión de este nuevo compuesto por la β -tubulina.

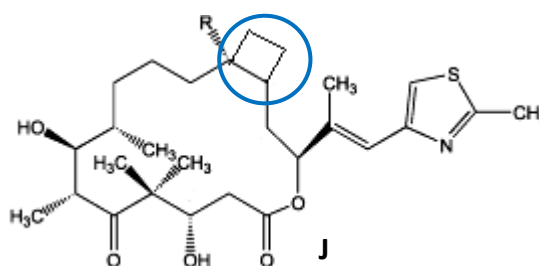
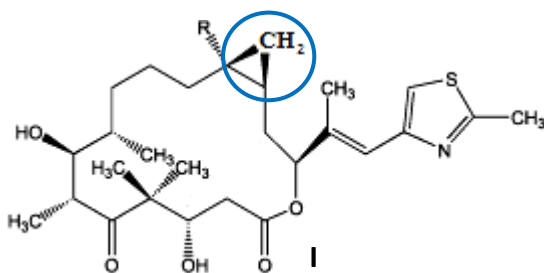


Por lo tanto, cuando la molécula tiene un grupo tiazol, resulta favorable para la unión la sustitución del grupo metilo por metiltio. Si tenemos una piridina, el sustituyente más favorable para que se lleve a cabo la unión con la β -tubulina es el metilo en posición C5.

5.6.7.- Modificación del grupo epoxi ²²

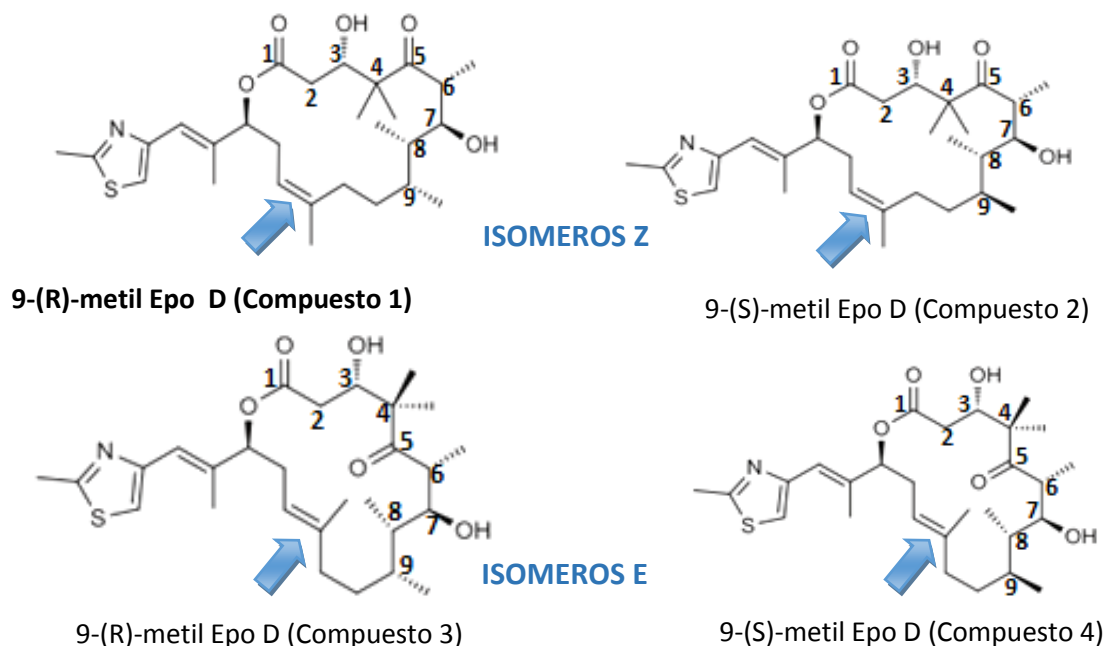
Se propone la modificación del grupo epoxi de la Epo A por un grupo cicloalquilo. En el caso de sustituirlo por un grupo ciclopropilo (molécula I) se produce un aumento de afinidad de unión. Sin embargo, si se reemplaza por un ciclobutilo (molécula J) se produce una disminución de la afinidad.

Por otro lado, la introducción de un grupo metilo en posición C12, independientemente de la presencia de un grupo epoxi o ciclopropilo, favorece la afinidad de unión.



5.6.8.- Modificaciones en la Epo D

Sang, Feng, Chen y col. realizaron un ensayo con la Epo D y análogos sintéticos de esta, sobre líneas celulares de cáncer de mama (LCM) y cáncer de mama resistente (LCMR). A pesar de que los análogos de la Epo D eran menos potentes que la molécula original, el isómero 9-(R)-Metil Epo D (compuesto 1) demostró tener aproximadamente un 35% más de actividad que el isómero 9-(S)-metil Epo D (compuesto 2). Además, estos isómeros Z resultaron a su vez ser más activos que los isómeros E.²³



Se evaluó el porcentaje de polimerización que experimentaba la tubulina en presencia de Epo D y los isómeros Z- 9-(R)-metil Epo D (compuesto 1) y Z- 9-(S)-metil Epo D (compuesto 2), obteniéndose como resultados un 43%, un 16% y un 9% respectivamente.²³

Compuesto	IC ₅₀ LCM (μM)	IC ₅₀ LCMR (μM)	% tubulina polimerizado (con 5 μM)
Epo D	0.014	0,010	43
1	0.99	0.51	16
3	7.7	7.3	No determinado
2	35.4	No determinado	9
4	93.4	> 100	No determinado

Células expuestas a los compuestos durante 72 horas.

Como se observa en la siguiente Fig.9, la superposición de las conformaciones del compuesto 1 y la Epo D (izquierda) es más exacta que la de ésta con el compuesto 2 (derecha).

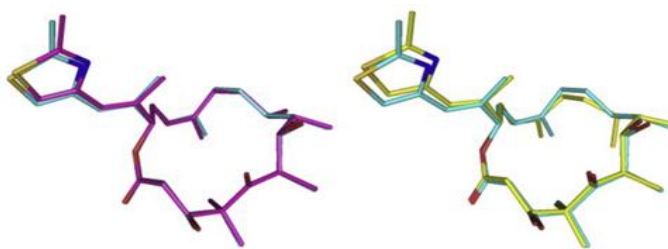
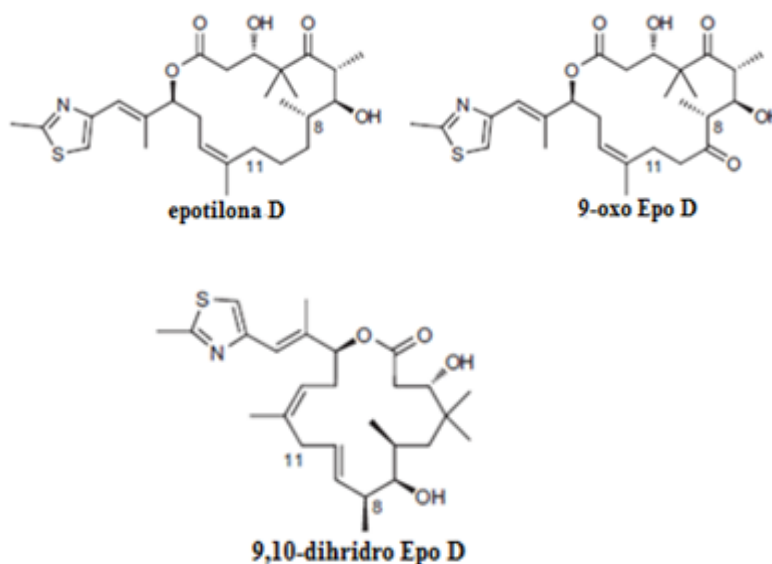


Fig. 10: Superposición de 1 y 2 con la Epo D

Por ello se entiende que el compuesto 1 sea el más activo entre los 4 análogos.

Sin embargo, la conformación bioactiva de la región flexible entre C8 y C11 de las epotilonas aún no ha sido confirmada, porque por ejemplo la 9-oxo Epo D es 30 veces menos activa que la Epo D, mientras que la 9,10-dehidroepotilona D preparada por Danishefsky y col. es más potente que la Epo D, y por ello se convirtió en un candidato de fármaco antitumoral.



5.6.- Relación estructura-actividad (REA) ^{11,22}

Una vez analizadas las modificaciones realizadas con el objetivo de mejorar la actividad de las epotilonas se pudo establecer la siguiente relación de estructura-actividad (REA):

- La configuración de los estereocentros C6; C8; C13; C15 debe ser la de los productos naturales.
- Es posible la sustitución de tiazol por piridina en la cadena lateral C15 y es esencial una configuración S de este carbono. En efecto una correcta localización del N en la cadena lateral de C15 es imprescindible para su unión a la His 227 de la β -tubulina.

- La sustitución del metilo del tiazol por un metiltio aumenta la afinidad de unión a la β -tubulina.
- El grupo epoxi puede reemplazarse por un grupo ciclopropilo (o un doble enlace).
- Un grupo metilo en C12 aumenta la actividad.
- El cambio del grupo éster por un grupo amida hace la molécula metabólicamente más resistente.

5.7.- Ensayos clínicos ²⁴

Entre de las distintas epotilonas, a día de hoy solo una se encuentra comercializada. Se trata de la ixabepilona (Ixempra[®]), aprobada en octubre de 2007 por la FDA (Food and Drugs Administration) y distribuida por Bristol-Myers Squibb. Está indicada como monoterapia o en combinación con capecitabina para el tratamiento del cáncer de mama metastásico o localmente avanzado en pacientes cuyos tumores son resistentes o refractarios a otros regímenes quimioterapéuticos como antraciclinas, taxanos o capecitabina.

Por otro lado, la patupilona, se halla en ensayos clínicos en fase II llevados a cabo por el laboratorio Novartis. En efecto se han observado resultados positivos para el cáncer de pulmón de células no pequeñas con metástasis cerebral en 2015. Sin embargo, los ensayos clínicos para el cáncer de mama con metástasis cerebral y la comparación de la patupilona con doxorubicina pegilada, han fracasado, en el 2014 y 2013 respectivamente. El laboratorio Novartis llevó a cabo un ensayo clínico de fase III en 2010 para el cáncer de ovario desarrollado, pero el fármaco no logró demostrar una ventaja de supervivencia significativa. En 2009 y 2010, la patupilona recibió la designación de fármaco huérfano por la FDA y la AEMPS para el tratamiento de cáncer peritoneal primario y cáncer de trompa de Falopio. Pero en 2011 fue retirado del registro de medicamento huérfano en la UE. ²⁵

En el caso de la sagopilona, los ensayos clínicos de fase II llevados a cabo por los laboratorios Bayer en 2008, para el tratamiento de cáncer de ovario resistente a platino, para el tratamiento del cáncer de próstata andrógeno independiente, para el cáncer de pulmón de células no pequeñas y para el melanoma mostraron resultados prometedores. Sin embargo, no se han seguido desarrollado ensayos clínicos avanzados durante varios años, por lo que la investigación se halla paralizada.

Con la Epo D (KOS-862) se han llevado a cabo ensayos clínicos de fase I y II con resultados prometedores, sin embargo el desarrollo clínico se halla interrumpido. No obstante, debido a la relación entre la inestabilidad de los microtúbulos y la enfermedad de Alzheimer se han realizado ensayos clínicos de fase I para dicha enfermedad.

Las taupatías degenerativas, de las cuales la enfermedad de Alzheimer es el ejemplo más destacado y común, se caracteriza por una hiperfosforilación de la proteína Tau y una disociación de tau de los microtúbulos.

Una de las funciones celulares de Tau es la estabilización de los microtúbulos mediante su unión a estos, manteniendo de este modo la red de microtúbulos esencial para el transporte axonal en las neuronas. El mal plegamiento y la agregación de los microtúbulos conduce a procesos neurodegenerativos en la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías.

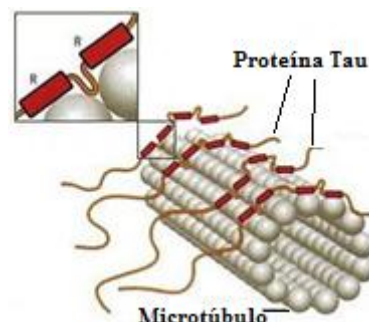
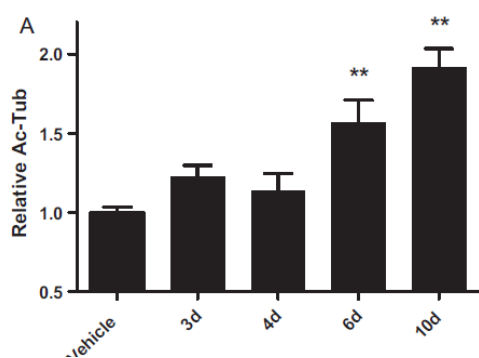


Fig.11: Estabilización de microtúbulos por Tau

Para determinar la capacidad de la Epo D para estabilizar los microtúbulos del sistema nervioso central, se realizó un ensayo dónde se empleó como biomarcador tubulina acetilada, ya que la α - tubulina cuando se encuentra en forma de microtúbulos estables es acetilada en la lisina 40, y al contrario, cuando no está polimerizada se desacetila rápidamente. Se administró a un grupo de ratones una dosis de 3 mg/kg de CNDR-66 a los 3 y a los 6 días, y la misma dosis de un compuesto control al inicio y a los 8 días. Después de cada tratamiento se preparaba un homogeneizado de cerebro y se analizaban los niveles de tubulina acetilada por ELISA.



Se comprobó que cuando se administraba la Epo D aumentaban los niveles de tubulina acetilada en el homogeneizado de cerebro.¹⁴

El hecho de que la epotilona D atravesase la barrera hematoencefálica sin ser expulsada por la glicoproteína P y que una vez en tejido neuronal estabilice los microtúbulos, es importante en

enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Además no se han observado signos de toxicidad en órganos ni alteraciones del sistema inmune, reacciones adversas comunes en tratamientos oncológicos. Esto se debe a que las dosis que se usaron son bajas, entre 30 y 100 veces menores que las utilizadas en pacientes con cáncer.

Estas enfermedades también se conocen como tauopatías, porque existe una deposición de la proteína Tau en agregados insolubles que supone una pérdida de su funcionalidad, conduciendo así a la desestabilización de microtúbulos, responsable de un mal transporte axonal.¹⁴

Por último, para la epotilona BMS-310705 se han realizado ensayos clínicos de fase I, obteniéndose resultados similares a los hallados en el caso de la ixabepilona. Sin embargo, al igual que en los casos anteriores, no se ha seguido con el desarrollo clínico de este fármaco en los últimos años.²⁴

6.- CONCLUSIONES

El descubrimiento de las epotilonas supuso un gran interés por parte de varios grupos de investigación, quienes desarrollaron métodos de obtención así como modificaciones para obtener moléculas más activas. Pese a que el PTX es el tratamiento de elección para el cáncer de mama, las epotilonas presentan ciertas ventajas frente a este, como es su mayor potencia antiproliferativa frente a células tumorales, su eficacia ante casos de resistencia a fármacos estabilizadores de microtúbulos y una disminución de los efectos adversos relacionados con este tipo de tratamiento. Por eso se han llevado a cabo ensayos clínicos de los cuales, el más exitoso fue el de la ixabepilona, que se encuentra aprobada por la FDA. La epotilona D por su parte, es candidata como tratamiento en la enfermedad de Alzheimer.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Danishefsky S, Zheng J, Horwitz S y col. Total synthesis of (–)-Epothilone B: an extension of the suzuki coupling method and insights into structure–activity relationships of the epothilones. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997;36(7):757.
- ² Nicolaou K, Vallberg H, Yang Z y col. Total synthesis of Epothilone A: the olefin metathesis approach. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997;36(12):166.
- ³ Schinzer D, Limberg A, Bauer A y col. Total synthesis of (–)-Epothilone A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997;36(5):523.
- ⁴ Gerth K, Bedorf N, Höfle G, Reichenbach H y col. Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum*. Production, physico-chemical and biological properties. *The Journal of Antibiotics.* 1996;49(6):560-563.
- ⁵ Bollaq D, McQueney P, Zhu J, Hensens O y col. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Research.* 1995;55(1):2325-33.
- ⁶ Roschangar F. Chemical Biology of Epothilones. *Angew Chem Int Ed.* 1998;37(15):2014-2045.
- ⁷ Nicolaou KC, Winssinger N, Pastor J, y col. Synthesis of Epothilones A and B in solid and solution phase. *Nature.* 1997;387(6630):268-72.
- ⁸ Tang L, Shah S, Chung L, Carney J y col. Cloning an heterologous expression of the epothilone gene cluster. 2000;(287):640-642.

- ⁹ Ballatore C, Brunden K, Hurynt D y col. Microtubule stabilizing agents as potential treatment for alzheimer's disease and related neurodegenerative tauopathies. *J Med Chem*. 2012;55(21):8979-8996.
- ¹⁰ Forli S. Epothilones: from discovery to clinical trials. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(20):2332-2321.
- ¹¹ Avendaño C, Menéndez JC. Anticancer Drugs Targeting Tubulin and Microtubules. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. 2015:359-390.
- ¹² Horwitz S. Taxol (paclitaxel): mechanism of action. *Ann Oncol*. 1994;5(6):3-6.
- ¹³ Ficha técnica de Taxol (Base de datos en internet): CIMA: AEMPS. 2012- [acceso 24 de abril de 2016]. [18 p.]. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/60210/60210_ft.pdf
- ¹⁴ Rogalska A, Marczak A, Gajek A y col. Induction of apoptosis in human ovarian cancer cells by new anticancer compounds, epothilone A and B. *Toxicology in vitro*. 2013;27(1):239-249.
- ¹⁵ Brunden K, Yao Y, Potuzak J y col. The characterization of microtubule-stabilizing drugs as possible therapeutic agents for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Pharmacol Research*. 2011;63(4):341-51.
- ¹⁶ Lopus M, Smiyun G, Miller H, Oroudjev E y col. Mechanism of action of ixabepilone and its interactions with the β III-tubulin isotype. *Cancer Chemother Pharmacology*. 2015; 76(5):1013-24
- ¹⁷ Zhan W, Jiang Y, Sharma S, Brodie PJ y col. C6-C8 bridged epothilones: consequences of installing a conformational lock at the edge of the macrocycle. *Chemistry & Biology*. 2011;17(52):14792-804
- ¹⁸ Martínez R, Interacciones de los microtúbulos con ligandos activadores de tubulina. Tesis doctoral. 2006
- ¹⁹ Stachel S, Lee C, Danishefsky S y col. On the interactivity of complex synthesis and tumor pharmacology in the drug discovery process: Total synthesis and comparative in vivo evaluations of the 15-aza epothilones. *Org. Chem*. 2001;66:4369-4378.
- ²⁰ Grubbs RH. Olefin metathesis. *Tetrahedron Prize*. 2004;34(60):7117-7140.
- ²¹ Nicolaou K, Paul King N y col. Ring-Closing Metathesis in the Synthesis of Epothilones and Polyether Natural Products. *Topics in Organometallic Chemistry*. 2001;1:73-104.
- ²² Martínez R, Díaz F, Andreu JM, O'Brate A y col. Interaction of Epothilone Analogs with the Paclitaxel Binding Site: Relationship between Binding Affinity, Microtubule Stabilization, and Cytotoxicity. *Chemistry & Biology*. 2004;11:225-236
- ²³ Sang F, Feng P, Chen J, Ding Y y col. Epothilone D and its 9-Methyl analogues: Combinatorial syntheses, conformation, and biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013; 68:321-332
- ²⁴ Schiess R y Altmann K. Epothilones. En: Levin J. *Macrocycles in Drug Discovery*. Connecticut: Royal society of chemistry; 2014.78-108
- ²⁵ Pharmacodia. *Patupilona*. http://en.pharmacodia.com/web/drug/1_1752.html (último acceso 25 mayo 2016).